

Köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların ve bireylerin etkisi*

Halil TOSUN¹, Ongun UYSAL²

¹ Kara Harb Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü, Ankara; ²Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: Bu çalışmada, köpek spermasının dondurulması üzerine farklı sperma sulandırıcıları ve sulandırıcıya katılan bovine serum albuminin (BSA) etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada, 2-4 yaşlarında 5 Alman Çoban köpeği kullanılmıştır. Araştırma süresince, haftada iki kez el masajı yöntemiyle her köpektan 10 olmak üzere toplam 50 ejakülat alınmıştır. Nativ spermalarda spermatozoa motilitesi ve spermatozoa yoğunluğu bakımından istatistiksel olarak bireyler arasındaki fark ($p<0.01$) önemli bulunurken, diğer spermatolojik özellikler yönünden bireyler arasındaki farklılıklar önemsiz ($p>0.05$) kaydedilmiştir. Dondurulmuş köpek spermalarında mtris-A (gliserol, BSA, yumurta sarısı) ve mtris-B (gliserol, yumurta sarısı) sulandırıcıları için çözürme sonrası spermatozoa motilitesi (%) 58.0 ± 11.3 , 55.8 ± 10.8 , anormal spermatozoa oranı (%) 11.1 ± 5.2 , 18.3 ± 4.5 ve ölü spermatozoa oranı (%) 29.8 ± 5.5 ve 37.4 ± 6.0 bulunmuştur. Laiciphos-A (gliserol, BSA, yumurta sarısı) ve laiciphos-B (gliserol, yumurta sarısı) için aynı değerler sırasıyla 34.0 ± 9.8 , 36.0 ± 8.7 ; 11.2 ± 4.2 , 11.0 ± 3.2 ; ve 27.7 ± 8.6 ve 28.4 ± 9.4 kaydedilmiştir. Çözürme sonrası spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle sulandırıcılar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli ($p<0.001$, $p<0.01$) bulunmuştur.

Sonuç olarak spermaların dondurulmasında kullanılan iki değişik sulandırıcıdan mtris çözürme sonrası spermatolojik özellikler üzerine daha olumlu etki yapmıştır. Modifiye trisle dondurulmuş-çözürülmüş spermalarda bovine serum albuminin spermatozoa motilitesini geliştirdiği ve spermatozoa membran bütünlüğünü yumurta sarısından daha iyi koruduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Bovine serum albumin, köpek, kryoprezervasyon, sperma, sulandırıcı.

Effect of different extenders and individuals in freezing of dog semen

Summary: The aim of this study was to investigate the effect of different semen extender and bovine serum albumine added to extender on freezing of dog semen. In study, 5 German Shepherd dog used for semen collecting were 2-4 years old. During research, a total of 50 ejaculates consist of 10 samples from each dog by massage method twice in a week. Differences among dogs for sperm motility and sperm concentration were significant ($p<0.01$) and no differences among dogs for other sperm characteristics were found significant ($p>0.05$) in fresh semen statistically. Post-thawing sperm motility (%) was found 58.0 ± 11.3 , 55.8 ± 10.8 , the percentage of abnormal sperm(%) 11.1 ± 5.2 , 18.3 ± 4.5 and the percentage of dead sperm (%) 29.8 ± 5.5 and 37.4 ± 6.0 for mtris A (glycerol, BSA, yumurta sarısı) and mtris B (glycerol, egg yolk) in frozen dog semen. respectively. The same spermatological characteristics (%) were recorded as 34.0 ± 9.8 , 36.0 ± 8.7 ; 11.2 ± 4.2 , 11.0 ± 3.2 and 27.7 ± 8.6 and 28.4 ± 9.4 for laiciphos-A (glycerol, BSA, yumurta sarısı) and for laiciphos-B (glycerol, egg yolk) respectively. Differences among extenders for post-thawing sperm motility, the percentage of abnormal sperm and the percentage of dead sperm were found significant statistically ($p<0.001$, $p<0.01$).

To sum up, one of different extenders used for semen freezing is mTris that was exert more positive effect on post-thawing spermatological characteristics. It was observed that sperm motility sperm membrane integrity were more protected by bovine serum albumin than egg-yolk in frozen-thawed semen by mtris.

Key words: Bovine serum albumine, cryopreservation, dog, extender, semen.

Giriş

Köpek yetiştiriciliğinde, diğer hayvan türlerinde olduğu gibi dölerme hastalıklarının önlenmesi, genetik yapılarının iyileştirilmesi, üstün bireylerden en yüksek ölçüde yararlanılabilmesi, seçkin damızlıkların elde edilmesi ve gen kaynaklarının korunması büyük önem taşır. Bu kapsamda birçok köpek ırkında spermatolojik özelliklerin ortaya koyulması yanında, spermanın uygun

solusyonlarla sulandırılarak dondurulması, kısa ve uzun süreli saklanması, gerektiğinde sun'i tohumlamada kullanılması ve bunu takiben yüksek dölverimi elde edilmesi hedefine yönelik araştırmalar uzun yıllar sürdürülmektedir.

Günümüzde köpek spermasının kısa süreli ya da dondurularak uzun süreli saklanması amacıyla sperma sulandırıcısı olarak çeşitli solusyonlar kullanılmaktadır.

* Bu çalışma yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Bunlar arasında Tes (N-Tris [hydroxymethyl] methyl-2 aminomethene sulfonic acid), Hepes (N-2 [hydroxymethyl] piperazine-n-2-ethane sulfonic acid) ve Pipes (piperazine-N, N-bis -2-ethane sulfonic acid) gibi tristen daha iyi buffer kapasitesine sahip zwitterionik solusyonlar kullanılmakla beraber, son yıllarda köpek spermasının dondurulmasında daha çok hazır ticari preparatlar (Laiciphos, Biociphos, Biladyl, Triladyl) tercih edilmektedir (12).

Silva ve Verstegen (12) laiciphos, biociphos ve tes/tris'ten oluşan üç farklı sulandırıcı ile dondurdukları köpek spermalarının çözündürme sonrası spermatozoa motilitesini laiciphos, biociphos ve tes/tris için sırasıyla % 65, 70 ve 50 canlı spermatozoa oranını ise % 78, 80 ve 65 saptadıklarını bildirmişlerdir.

Pipes, bes, tes, tris sulandırıcılarına üç değişik potasyumlu tampon ilavelerinin (KHCO_3 , K_3PO_4 , KOH) köpek spermasının dondurulması üzerine etkilerini inceleyen Smith (13), 1:2 oranında % 50 Pipes/ KOH + % 25 sodyum sitrat+ % 25 dekstroz+ % 20 yumurta sarısı + % 9 gliserol ile çözündürme sonrası en iyi spermatozoa motilitesi elde etmiştir.

Spermanın sıvı azot buharında dondurulmasında spermatozoanın soğuk şokundan olumsuz etkilenmeleri nedeniyle spermatolojik özelliklere ait değerler değişebilmektedir (20). Hücre membranlarında oluşan perforasyonların, özellikle akrozomda bulunan ve fertilizasyonda görev alan enzimlerin kaybına yol açtığı ve bu spermatozoanın döllemeyi yapamadığı kabul edilmektedir (21). Değişik ve çeşitli oranlarda kryoprotektanları içeren sperma sulandırıcılarının sözü edilen dondurma aşamalarında spermatozoayı soğuk ekisinden korumaları, buldukları ortamdaki madde alışverişini ayarlamaları ve membranları çevresinde oluşan buz kristalizasyonlarının olumsuz etkilerinin en aza indirilmesiyle olduğu bilinmektedir (8). Seminal plazma spermatozoon için koruyucu faktörleri içerdiği gibi, duyarlılığını artırıcı faktörleri de bulunduğundan ejaküle edilmiş spermadaki spermatozoa epididimal spermatozoaya göre soğuk şokuna daha duyarlıdır ve daha fazla olumsuz etkilenmektedir (22).

Yumurta sarısı dondurma işlemlerinin zararlı etkilerinden spermatozoayı koruması amacıyla köpek spermasının saklanması bugüne kadar % 1-20 oranları arasında kullanılmıştır. Son yıllarda spermanın dondurulması çalışmalarında birçok araştırmacı (4, 23) seminal plazma komponentlerinden biri olan BSA dan yararlanmış ve membran stabilizatörü olan BSA'nın yumurta sarısının spermatozoa membranları üzerine koruyucu etkisini geliştirdiğini, hatta BSA ile kombinasyonu durumunda yumurta sarısı konsantrasyonunun düşürülebileceğini bildirmişlerdir.

Kimi araştırmacılar (4, 17) kryoprotektan etkisinden faydalanmak için % 6 (w/v) gibi yüksek miktarda BSA'yı köpek spermasının sulandırılmasında kullanırken, kimileri de (2, 10) % 5 (w/v) oranında protein desteği olarak faydalanmışlardır.

Uysal ve ark. (19) köpek spermasının dondurulması üzerine BSA'nın etkilerini inceledikleri çalışmalarında, BSA'nın ve yumurta sarısının sulandırıcıda tek başına kullanılmalarıyla ulaşılan sonuçlarla karşılaştırıldığında, % 10 yumurta sarısı + 10mg/ml BSA içeren mtris sulandırıcısıyla, çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi (% 50.5) ve HOS-test değeri (% 58.5) elde ettiklerini, yumurta sarısı BSA kombinasyonunun sinerjik etki oluşturduğu ve soğuk şokundan spermatozoayı daha iyi koruduğunu ifade etmişlerdir.

Bu çalışma ile, köpek spermasının dondurulmasında farklı sulandırıcıların etkinliğinin değerlendirilmesi yanında, dondurma/çözündürme işlemleri sırasında soğuk şokunun spermatozoa üzerinde neden olduğu hasarı azaltmak üzere membran stabilizatörü olarak kullanılan bovine serum albumininin, çözündürme sonrası kimi spermatolojik parametrelere etkisinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada, 4. ncü Ana Jet Üs Komutanlığı AK-INCILAR bünyesindeki KÜVEM de (Köpek Üretim ve Eğitim Merkezi) bulunduran 2-4 yaş arasında 5 damızlık Alman Çoban köpeği kullanıldı. Köpeklerin bakımları bağlı buldukları komutanlık tarafından gerçekleştirildi ve beslenmede hazır köpek yemi kullanıldı.

Spermanın alınması ve değerlendirilmesi

Araştırmada her köpektan iki gün ara ile 10, toplamda ise 50 ejakülat alındı ve kullanıldı. Spermaların alınması el masajı yöntemi (15) uygulanarak kızgın bir dişi köpeğin fantom olarak kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Elde edilen ejakülatların 2. fraksiyonunda başlıca spermatolojik özellikler değerlendirildi. Nativ spermalar, sperma miktarı (ml), spermatozoa motilitesi (%), spermatozoa yoğunluğu ($\times 10^6$), anormal spermatozoa oranı (%), ölü spermatozoa oranı (%) ve spermanın pH değeri yönüyle muayene edildi.

Spermanın sulandırılması ve dondurulması

Spermanın sulandırılması amacıyla modifiye TRIS (T- 1378, Sigma) ve LAICIPHOS (3100103, IMV) solusyonları kullanıldı. Bu ana solusyonlar % 10 yumurta sarısı, ve % 6 gliserol (G-5516, Sigma) ile desteklendi. Spermatolojik özellikleri değerlendirilen her köpeğin sperması dört eşit kısma bölündü ve bir tohumlama dozunda 200×10^6 motil spermatozoa bulunduracak şekilde yalnızca yumurta sarısı içeren mtris-B ve laiciphos-B ve 50 mg/ml BSA (Albumin, Bovine Fraction V; A-9647,

Sigma) ile kombine edilmiş mtris-A ve laiciphos-A olmak üzere 4 ayrı solusyonla sulandırıldı. Spermalar sulandırıldıktan hemen sonra 0.5 ml lik payetlere çekilip açık olan uçları ısı yardımıyla kapatıldı ve termos içerisinde 1 saatte laboratuvara ulaştırıldı. Buzdolabına (+4°C deki) yerleştirilerek 1.5 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyon süresi sonunda payetler, sıvı azot seviyesinden 4 cm yükseklikte (-100-120°C'da) 10 dakikada donduruldu ve -196°C daki sıvı azotta saklandı.

Spermanın çözdürülmesi ve in vitro değerlendirilmesi

Her köpek için 40 olmak üzere toplam 200 payet 37°C daki su banyosunda 30 saniyede çözdürülerek spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle muayene edildi.

Araştırmada, istatistiki açıdan gruplararası farklılıkların saptanmasında Varyans Analizi tekniği, aralarındaki farklılık önemli bulunan grupların karşılaştırılmasında Duncan testi kullanılmıştır (14).

Bulgular

Çalışmada, her birinden 10 olmak üzere 5 Alman Çoban köpeğinden toplam 50 ejakülat alındı. Araştırmada kullanılan 5 Alman Çoban köpeğinin nativ spermalarında sperma miktarı, spermatozoa motilitesi, sper-

matozoa yoğunluğu, anormal spermatozoa oranı, ölü spermatozoa oranı ve spermanın pH sına ait genel ortalama değerler ise sırasıyla 2.8±2.5 ml, % 81.9±6.4, 505.8±174.8 (X10⁶/ml), % 9.4±3.1, % 7.02±2.2 ve 6.4±0.1 saptandı (Tablo 1).

Köpekler arasında yapılan istatistiki değerlendirmede spermatozoa motilitesi ve spermatozoa yoğunluğu bakımından bireyler arasındaki farklılıklar (p<0.01) önemli bulunurken, diğer spermatolojik özellikler yönünden bireyler arasındaki farklılıklar önemsiz (p>0.05) kaydedildi.

Bu çalışmada, dondurulmuş spermallerden her sulandırıcı için 50 olmak üzere toplam 200 payet 30 saniyede 37°C lik su banyosunda çözdürüldü. Dondurulmuş köpek spermalarında mtris-A sulandırıcısı ile çözdürme sonrası spermatozoa motilitesi (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve ölü spermatozoa oranı (%) sırasıyla 58.0±11.3, 11.1±5.2 ve 29.8±5.5 olarak saptanırken, mtris-B sulandırıcısı ile aynı değerler 55.8±10.8, 18.3±4.5 ve 37.4±6.0 kaydedildi. Laiciphos-A sulandırıcısı için benzer değerler sırasıyla 34.0±9.8, 11.2±4.2 ve 27.7±8.6 bulunurken, laiciphos-B sulandırıcısı için sırasıyla 36.0 ±8.7, 11.0 ±3.2 ve 28.4±9.4 olarak saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Köpek spermalarında başlıca spermatolojik özellikler.
Table 1. Principal spermatological characteristics in fresh dog semen.

Köpek	Sperma miktarı (ml) X±SX	Spermatozoa motilitesi (%) X±SX	Spermatozoa yoğunluğu (x10 ⁶) X±SX	Anormal spermatozoa oranı (%) X±SX	Ölü spermatozoa oranı (%) X±SX	pH X±SX
1	2.8±0.3	85.5±4.4 ^a	667.0±125.9 ^a	9.8±2.3	7.0±1.7	6.4±0.1
2	2.8±0.4	73.0±6.9 ^b	246.2±65.7 ^d	8.8±1.5	8.5±2.9	6.4±0.1
3	2.8±0.3	82.0±3.5 ^a	470.0±109.8 ^c	11.2±6.2	6.1±2.0	6.4±0.1
4	2.9±0.2	84.5±3.8 ^a	557.5±110.0 ^{bc}	8.6±1.0	6.7±2.2	6.4±0.1
5	2.9±0.2	84.5±3.8 ^a	587.5±80.1 ^{ab}	8.7±1.1	6.8±1.9	6.4±0.1
Genel ortalama	2.8±2.5	81.9±6.4	505.8±174.8	9.4±3.1	7.02±2.2	6.4±0.1

n: 10

a, b, c, d, ab, bc: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.

Tablo 2. Farklı sulandırıcılarla dondurulmuş köpek spermalarında çözdürme sonrası kimi spermatolojik değerler.
Table 2. Post-thawing some spermatological values in dog semen frozen by different diluents.

Sulandırıcı	Spermatozoa motilitesi (%) X±SX	Anormal spermatozoa oranı (%) X±SX	Ölü spermatozoa oranı (%) X±SX
mtris-A	58.0±11.3 ^a	15.1±5.2 ^a	29.8±5.5 ^a
mtris-B	55.8±10.8 ^a	18.3±4.5 ^b	33.4±6.0 ^b
Laiciphos-A	34.0±9.8 ^b	11.2±4.2 ^c	27.7±8.6 ^a
Laiciphos-B	36.0±8.7 ^b	11.0±3.2 ^c	28.4±9.4 ^a

n: 50

a, b, c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.

Tablo 3. Dondurulmuş köpek spermalarında çözündürme sonrası bireysel kimi spermatolojik değerler.
Table 3. Individual some spermatological values in frozen dog semen.

Köpek	Spermatozoa motilitesi (%) X±SX	Anormal spermatozoa oranı (%) X±SX	Ölü spermatozoa oranı (%) X±SX
1	46.6±2.3	15.5±1.0 ^a	24.8±1.7 ^a
2	46.0±2.8	10.5±0.6 ^b	26.4 ±1.7 ^a
3	43.8±2.7	13.6±0.9 ^c	35.3±1.8 ^b
4	45.7±3.0	15.5±1.0 ^{ac}	36.0±2.4 ^b
5	47.0±2.8	15.8±1.0 ^{ac}	26.7±1.9 ^a
Genel ortalama	45.8±2.7	14.2±0.9	29.8±1.9

n: 40

a, b, c: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan grup ortalamaları arası fark önemli.

Sulandırıcılar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmelerde ise çözündürme sonrası spermatozoa motilitesi, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı için grup ortalamaları arası fark önemli ($p<0.001$, $P<0.01$) bulundu.

Çalışmada her köpeğin dondurulup/çözündürülen 40 ar spermaları değerlendirildi ve toplam 200 ejakülatta çözündürme sonrası genel ortalama spermatozoa motilitesi (%), anormal spermatozoa oranı (%) ve ölü spermatozoa oranı (%) sırasıyla 45.8±2.7, 14.2±0.9 ve 29.8±1.9 olarak kaydedildi (Tablo 3).

İstatistiksel olarak toplam 50 ejakülattın genel ortalama değerleri üzerinden spermatozoa motilitesi yönüyle köpekler arasında gözlenen farklılıklar önemsiz olurken ($p>0.05$), anormal spermatozoa ve ölü spermatozoa oranı için önemli farklılıklar bulundu ($p<0.05$, $p<0.001$).

Tartışma ve Sonuç

Köpek spermalarının dondurulmasında bugüne kadar krebs-ringer, sodyum sitrat, laktoz, süt gibi solusyonlar kullanılmış olmakla beraber, son yıllarda yoğun olarak Tris, Tes, Bes, Hepes, Mes, Pipes, Mops gibi zwitterionic bufferlar dışında köpek spermaları Laiciphos, Biociphos, Biladyl ve Triladyl ticari preparatlarla da uzun süreli saklanabilmektedir (9, 12).

Çalışmada, mtris-A ve mtris-B ile dondurulmuş spermalardan elde edilen spermatozoa motiliteleri (% 58.0±11.3, % 55.8±10.8) laiciphos-A ve laiciphos-B (% 34.0±9.8, % 36.0±8.7) den önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Spermatozoa motilitesi spermatozoanın buldukları ortamda madde alışverişleri, yani membranlarından madde transportuyla yakından ilgilidir ve dolayısıyla membranları sağlam spermatozoanın motil olduğundan söz edilebilir (6). Bu çalışmada, dondurulmuş spermalardan elde edilen çözündürme sonrası spermatozoa motilitesine ait %58.0 değeri, Daşkın ve ark. larının (3) bulduğu değerden (% 62.5), ve Uysal ve ark. larının (20) 70°C'da 5 saniyede çözdürdükleri Alman

Çoban köpeği spermalarındaki spermatozoa motilitesinden (% 66.3) düşük bulunmuştur. Bundan başka, Lees ve Castleberry'nin (7) laktoz-yumurta sarısı-glyserol sulandırıcısı ile dondurdukları spermalarda çözündürme sonrası buldukları spermatozoa motilitesinden (% 50,2) ve yine Uysal ve ark. larının (18) Alman Çoban köpeği spermalarını BSA ve yumurta sarısı kombinasyonlarının etkisini inceledikleri çalışmalarında saptadıkları motilite değerinden (%37,0) yüksek kaydedilmiştir. Anormal spermatozoa oranı, laiciphosla dondurulmuş spermalarda mtrise göre önemli ölçüde daha düşük saptanmıştır ($p<0.001$). Her iki sulandırıcıyla elde edilen çözündürme sonrası anormal spermatozoa oranlarının fertilititeyi olumsuz etkileyecek düzeylere (% 20) ulaşmadığı gözlenmiştir (16). Çözündürme sonrası ölü spermatozoa oranı ise mtris-B ile diğer sulandırılardan önemli ölçüde yüksek kaydedilmiştir ($p<0.01$).

Yumurta sarısı ve bovine serum albumini (BSA) spermayı soğuk şokuna karşı koruyarak kriyoprotektan etki göstermektedir (10, 17). Blesbois ve ark. (1), sulandırıcıya membran stabilizatörü olarak bovine serum albumini eklenmesinin spermatozoa üzerine olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ancak BSA'nın en önemli özelliklerinden biri de spermanın dondurulması işlemi sırasında antioksidan özelliği ile oksidatif reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan serbest radikalleri elimine etmesi yanında soğuk şokunun zararlı etkilerinden (çözündürme sonrası spermatozoa motilitesini ve membranlarını) spermatozoayı korumasıdır (5, 11). Bunlardan başka albumin ve HCO₃ iyonlarının fare, hamster, tavşan spermatozoasının hiperaktivasyonu için gerekli maddeler oldukları da belirlenmiştir (23).

Söz konusu çalışmada, dondurulmuş köpek spermalarında BSA'nın yukarıda ifade edilen çok yönlü olumlu etkisi ile çözündürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi (% 58.0±11.3) 50 mg/ml BSA+ %10 yumurta sarısı bulduran mtris-A dan elde edilmiştir. Ölü ve anormal spermatozoa oranı da normal sayılabilecek ve

fertiliteyi etkilemeyecek sınırlar içerisinde kabul edildiğinden, BSA'nın mtris + yumurta sarısı sulandırıcısı ile kullanılması, köpek spermatozoasının dondurulması ve çözdürülmesi üzerine pozitif etki yaptığını göstermektedir. Dolayısıyla BSA'nın yumurta sarısı ile kombine kullanılması durumunda çözdürme sonrası spermatolojik parametreleri tek başına yumurta sarısından daha iyi koruduğu görülmüştür.

Bovine serum albumini bulunduran laiciphos sulandırıcısının çözdürme sonrası mtris gibi istenen ölçülerde spermatolojik değerlere ulaşamaması BSA ile ilgili değil, büyük olasılıkla laiciphos sulandırıcısının köpek spermalarının dondurulması için mtris kadar uygun olmamasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü laiciphos-A ve B ile elde edilen çözdürme sonrası tüm spermatolojik parametrelerde gruplar arasında birbirine yakın değerler gözlenmiştir. Dolayısıyla, BSA beklenen olumlu etkisini bu sulandırıcı içerisinde göstermediğinden ya da sulandırıcıyla bir geçimsizlik söz konusu olduğundan söz edilebilir.

Bireysel kimi spermatolojik özelliklerin değerlendirilmesinde, çözdürme sonrası en yüksek spermatozoa motilitesi % 47.0±2.8 ile 5 nolu köpekten elde edilen spermalarda saptanırken, en düşük anormal spermatozoa oranı % 10.5±0.6 ile 2 nolu köpeğin, en düşük ölü spermatozoa oranı ise % 24.8±1.7 ile 1 nolu köpeğin spermalarında kaydedilmiştir. Bu çalışmada, çözdürülmüş köpek spermalarında spermatozoa motilitesi yönüyle bireyler arasında gözlenen farklılıklar önemsiz (p>0.05) bulunurken, anormal spermatozoa oranı ve ölü spermatozoa oranı yönüyle önemli olmuştur (p<0.05, p<0.001). Dolayısıyla her köpeğin spermasının, sulandırıcılardan farklı etkilendiği ve buna bağlı olarak dondurma ve çözdürme işlemlerine dirençlerinin de farklı olduğundan bahsedilebilir.

Araştırmadan elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, köpek spermasının dondurulmasında mtris'in laiciphos'dan daha iyi çalıştığı, BSA'nın da yumurta sarısı ile kombine edilmesi durumunda, spermatozoa motilitesini geliştirdiği ve spermatozoa membran bütünlüğünü daha iyi koruduğu gözlenmiştir.

Kaynaklar

1. **Blesbois E, Caffin JP** (1992): 'Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4 °C. *Br Poult Sci*, **33**, 663-670.
2. **Braun J, Hochi S, Oguri N, Sato K, Torres-Boggino F** (1995): Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen thawed stallion spermatozoa. *Cryobiology*, **32**, 478-492.
3. **Daşkın A, Tekin N, Akçay E** (2003): Köpeklerde transservikal – intrauterin ve intravaginal tohumlama yöntemlerinin dölverimine etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*, **27**, 235-239.
4. **De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Das JH, Colenbrander B, Verkleij AJ** (1993): Effect of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, **30**, 32-44.
5. **Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SI, Day BN** (1994): Use of low salt culture medium for in vitro maturation of porcine oocytes is associated with elevated oocytes glutathione levels and enhanced male pronuclear formation after in vitro fertilization. *Biol Reprod*, **51**, 633-639.
6. **Jejendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Palaez M, Crabo BG, Zaneveld JD** (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, **70**: 219.
7. **Lees GK, Castleberry MW** (1977): The use of frozen semen for artificial insemination of German Shepherd dogs. *J Anim Hosp Assoc*, **13**, 382-385.
8. **Moce E, Vicente JS, Lavara R** (2003): Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, **60**, 115-123.
9. **Morton DB, Bruce SG** (1989): Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil*, **39**, 311-316.
10. **Müller B, Kircher C** (1978): Influence of seminal plasma proteins on motility of rabbit spermatozoa. *J Reprod Fertil*, **54**, 167-172.
11. **Risopatron J, Catalan S, Miska W, Schell WB, Sanchez, R** (2002): Effect of albumine and polyvinlyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro. *Reprod Dom Anim.*, **37**, 347-351.
12. **Silva LDM, Verstegen JP** (1995): Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, **44**, 571-579.
13. **Smith FO** (1985): Cryopreservation of canine semen. *Technique and performance* Diss Abstr Int B-Sci and Engin, **11**, 3441.
14. **Sümbüllüoğlu, K., Sümbüllüoğlu, V.** (1993): *Biyoistatistik*. 4. Baskı, Özdemir Yayıncılık.
15. **Tekin N, İzgür H, Özyurt M** (1987): Köpeklerde penis masajı yöntemiyle sperma alma ve başlıca spermatolojik özellikler üzerinde araştırmalar. *Selçuk Üniv Vet Fak Derg*, **1**, 83-95.
16. **Tekin N** (1990): Erkek üreme organlarının muayenesi (Androlojik muayeneler). In: *Theriogenoloji Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama Obstetrik ve İnfertilite*. Ed: E Alaçam, 53-67, Nuruol matbaacılık A.Ş., Ankara.
17. **Trimeche A, Anton M, Renard P, Gabdemer, G, Tainturier D** (1997): Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of poitou jackass sperm. *Cryobiology*, **34**, 385-393.
18. **Uysal O, Korkmaz T** (2004): Evaluation of membrane integrity by hypoosmotic swelling-eosine test. *Indian Vet J*, **81**, 1229-1231.

19. **Uysal O, Varışlı Ö, Yavaş İ. Bucak M N, Tosun H** (2005): Cryopreservation of canine semen at different freezing/thawing programs. *Indian Vet J*, (Baskıda).
20. **Uysal O, Korkmaz T, Tosun H** (2005): *Effect of bovine serum albumine on freezing of canine semen*. *Indian Vet J*, **82**, 97-98.
21. **Weitze KF** (1981): *Tiefgefrierkonservierung von kaninchensperma. 1. bedutung der anzahl intakter spermien für den besamungserfolg*. *Zuchthygiene*, **16**, 212-218.
22. **Weitze KF, Petzoldt R** (1992): *Preservation of gamets*. *Anim Reprod. Sci*, **28**, 229-235.
23. **Yanagimachi R** (1988): *Mammalian fertilization*. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed: Knobil E., Neill J. Et. All. Chapter 5, Raven Press, Newyork, USA.

Geliş tarihi: 28.12.2005 / Kabul tarihi: 24.04.2006

Yazışma adresi

Doç Dr. Ogun Uysal

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Anabilim Dalı,
06110, Dışkapı, Ankara.

e-mail: ouysal@veterinary.ankara.edu.tr